

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-535659

(P2002-535659A)

(43) 公表日 平成14年10月22日 (2002. 10. 22)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	特許出願 (参考)
G 0 1 N 27/62		G 0 1 N 27/62	V 2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/37		C 1 2 Q 1/37	4 B 0 6 3
G 0 1 N 33/68	Z N A	G 0 1 N 33/68	Z N A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 45 頁)

(21) 出願番号	特願2000-595162(P2000-595162)
(86) (22) 出願日	平成12年1月12日 (2000. 1. 12)
(85) 翻訳文提出日	平成13年7月23日 (2001. 7. 23)
(86) 国際出願番号	P C T / U S 0 0 / 0 0 7 9 0
(87) 国際公開番号	W O 0 0 / 4 3 7 9 2
(87) 国際公開日	平成12年7月27日 (2000. 7. 27)
(31) 優先権主張番号	6 0 / 1 1 6 , 5 0 2
(32) 優先日	平成11年1月20日 (1999. 1. 20)
(33) 優先権主張国	米国 (U S)
(31) 優先権主張番号	6 0 / 1 5 6 , 6 7 7
(32) 優先日	平成11年9月29日 (1999. 9. 29)
(33) 優先権主張国	米国 (U S)

(71) 出願人	ザ プロクター アンド ギャンブル カ ンパニー アメリカ合衆国オハイオ州, シンシナティ ー, ワン プロクター アンド ギャンブ ル プラザ (番地なし)
(72) 発明者	トーマス ウッズ ケアフ アメリカ合衆国 45242 オハイオ州 シ ンシナティ パーンズリー コート 9896
(72) 発明者	ロバート スコット ヤングクウィスト アメリカ合衆国 45040 オハイオ州 メ イソン チャールストン ノール コート 8511
(74) 代理人	弁理士 谷 義一 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリペプチドの配列を決定するための方法およびキット

## (57) 【要約】

本発明の開示は、ポリペプチドの配列の決定に有用な方法およびキットを提供する。この方法は、ポリペプチドまたはそのペプチドのN末端を誘導化することを含む。得られた1つまたは複数の誘導化分析物のマススペクトル分析は、当業者によく知られた技法を用いることによって容易に解釈されるスペクトルを提供する。本発明の開示はまた、この方法を実行する便宜を向上させるキットを記載する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ポリペプチドのアミノ酸配列を決定する方法であって、

(a) ポリペプチドのN末端、あるいはそのポリペプチドの1つまたは複数のペプチドのN末端を、ポリペプチドまたはペプチドと結合したときに2未満、好ましくは0未満、より好ましくは-2未満のpKaを有する1つまたは複数の酸性部分で誘導化し、1つまたは複数の誘導化分析物を提供する工程と、

(b) 質量分析技法を用いて1つまたは複数の誘導化分析物を分析し、切断パターンを提供し、好ましくはその切断パターンが本質的にaイオンおよびbイオンを含まない工程と、

(c) その切断パターンを解釈する工程と、  
を含むことを特徴とする方法。

【請求項2】 質量分析技法が、MALDI PSD質量分析、好ましくは正イオンモードPSD MALDI、またはエレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析、好ましくはタンデムエレクトロスプレーイオン化質量分析であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】 切断パターンの解釈が、市販のソフトウェアプログラムまたはデータベースの使用を含むことを特徴とする請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 ポリペプチドが合成ポリペプチドであることを特徴とする請求項1から3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】 ポリペプチドのペプチドが消化によって生成され、好ましくはその消化が化学的消化であり、より好ましくはその化学的消化がプロモシアン消化であることを特徴とする請求項1から4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】 消化が酵素的消化であり、好ましくは酵素的消化が、エンドプロテイナーゼLysC消化、エンドプロテイナーゼArgC消化、トリプシン消化、およびキモトリプシン消化から選択されることを特徴とする請求項5に記載の方法。

【請求項7】 酸性部分が1つまたは複数のスルホン酸またはジスルホン酸誘導体であり、好ましくは酸性部分が、2-スルホアセチル部分、3-スルホプロピオニル部分、または2-スルホベンゾイル部分であることを特徴とする請求

項 1 から 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】 ポリペプチドのアミノ酸配列を決定する際に用いるキットであって、

( a ) ポリペプチド、あるいはそのポリペプチドの 1 つまたは複数のペプチドと結合したとき、2 未満の  $pK_a$  を有する 1 つまたは複数の酸性部分を提供する 1 つまたは複数の酸性部分試薬と、

( b ) ポリペプチドの N 末端、あるいはそのポリペプチドの 1 つまたは複数のペプチドの N 末端を、1 つまたは複数の酸性部分試薬で誘導化する手段と、  
を具えることを特徴とするキット。

【請求項 9】 誘導化する手段が 1 つまたは複数の保持装置を含み、好ましくは酸性部分試薬がその保持装置内に存在し、好ましくは誘導化するための手段がさらに緩衝剤系を含むことを特徴とする請求項 8 に記載のキット。

【請求項 10】 1 つまたは複数の消化助剤をさらに含むことを特徴とする請求項 8 または 9 に記載のキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## (発明の分野)

本発明は、質量分析技法を用いるポリペプチドの配列の決定を可能にする方法およびキットに関する。この方法およびキットは、例えば生物、薬剤、身体の洗浄、および布の洗濯の分野で用いる高分子量ポリペプチドを同定するために特に有用である。

## 【0002】

## (発明の背景)

近年、高感度のペプチドおよびポリペプチドの配列決定の適用分野に関して、マトリックス支援レーザ脱離イオン化(MALDI)質量分析、およびエレクトロスプレーイオン化が開発された。例えば、Spengler等、「Peptide Sequencing by Matrix-assisted Laser-desorption Mass Spectrometry」、Rapid Communications in Mass Spectrometry、Vol. 6、105～108頁、1992年、Spengler等、「Fundamental Aspects of Postsource Decay in Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry」、Journal of Physical Chemistry、Vol. 96、9678～9684頁、1992年、Kaufmann等、「Mass Spectrometric Sequencing of Linear Peptides by Production Analysis in a Reflectron Time-of-flight Mass Spectrometer Using Matrix-assisted Laser Desorption Ionization」、Rapid Communications in Mass Spectrometry、Vol. 7、902～910頁、1993年、Kaufmann等、「Sequencing of Peptides in a Time-of-flight Mass Spectrometer:

Evaluation of Postsource Decay Following Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI)」、International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes、Vol. 131、355～385頁、1994年、Kaufmann等、「Post-source Decay and Delayed Extraction in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Reflectron Time-of-Flight Mass Spectrometry」、Rapid Communications in Mass Spectrometry、Vol. 10、1199～1208頁、1996年、およびSpengler、「Post-source Decay Analysis in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biomolecules」、Journal of Mass Spectrometry、Vol. 32、1019～1036頁、1997年、Carr等、「Integration of Mass Spectrometry in Analytical Biotechnology」、Analytical Chemistry、Vol. 63、2802～2824頁、1991年、Yates III等、「Mining Genomes With MS」、Analytical Chemistry、Vol. 68、534A～540A頁、1996年、Morris等、「High Sensitivity Collisionally Activated Decomposition Tandem Mass Spectrometry on a Novel Quadrupole/Orthogonal Acceleration Time-of-Flight Mass Spectrometer」、Rapid Communications in Mass Spectrometry、Vol. 10、889～896頁、1996年を参照されたい。

【0003】

MALDIは、質量分析の分野にいくつかの利点を提供する。例えば、MALDIは、従来のエレクトロスプレー三連四重極装置に比べてより高い感度を提供する。飛行時間質量分析器と組み合わせて使用すると、MALDIは三連四重極装置で分析され得るものより高い質量のペプチドにも適用できる。MALDIはまた、最小の試料精製で複合混合物を分析するのに有用である。他方、エレクトロスプレーイオン化は、液体クロマトグラフィ（LC）および様々な形態のキャピラリー電気泳動（CE）を含む強力な分離技法に容易に接続される。試料精製および導入装置としてLCおよびCEを用いるとき、高度に自動化された分析が可能である。

#### 【 0 0 0 4 】

しかしながら、現行のMALDI、およびより少ない程度でエレクトロスプレーイオン化質量分析法も、予測可能なタンデム質量分析切断パターンを十分に提供できないことがある。例えば、複数のイオン系列（aイオン、bイオン、およびyイオンを含む）が典型的に観測され、効率的に解釈および配列決定するには複雑すぎるMALDIポストソース分解スペクトルを生じる。エレクトロスプレーイオン化によって生成された多価前駆イオンから、複数のイオン系列（bイオン、およびyイオン）、さらに内部フラグメント、ならびに一価および多価イオンの両方が形成され、結果として生じたタンデムマススペクトルは、多くの場合新規に解釈するのが困難である。したがって、切断に伴う問題は、質量分析を用いて迅速にポリペプチドの配列決定をする能力を制限する。その結果、この分野において、質量分析、特にMALDI質量分析の有用性は限られている。

#### 【 0 0 0 5 】

いくつかの研究グループが、化学誘導化技法を用いることによって、ポリペプチドの配列決定の分野において質量分析の有用性を向上させることを試みてきた。そのような技法は、感度を高め、結果として得られるスペクトルの複雑さを減少する目的で、ペプチドのMSMSスペクトルにおいて切断を促進し方向づけるために用いられている。これらの知られている技法のほとんどは、陽イオン誘導体を提供する。例えば、Kidwell等、「Sequencing of Peptides by Secondary Ion Mass Spectr

ometry], Journal of the American Chemical Society, Vol. 106, 2219~2220頁、1984年(第四級アンモニウム基を用いた誘導化、スタティックSIMSイオン化法を用いる分析(MALDIおよびエレクトロスプレーイオン化の開発前))を参照されたい。低エネルギー衝突活性化を伴うMALDIおよびエレクトロスプレーイオン化を用いるそのような技法の適用は、一般に有効であることは証明されていない。

【0006】

より最近では、質量分析法を用いるペプチド/ポリペプチド配列決定を向上させるために、研究者等は他の誘導化技法を用いている。例えば、トリプシンペプチド(トリプシンによる消化によって生成されたペプチド)に存在するシステイン残基の酸化が、エレクトロスプレータンデム質量分析を用いる切断を向上させる可能性があることが示されている。例えば、Gaskell等、「Role of the Site of Protonation in the Low-Energy Decompositions of Gas-Phase Peptide Ions」、Journal of the American Society of Mass Spectrometry, Vol. 7, 522~531頁、1996年、およびGaskell等、「Influence of Cysteine to Cysteic Acid Oxidation on the Collision-Activated Decomposition of Protonated Peptides: Evidence for Intraionic Interactions」、Journal of the American Society of Mass Spectrometry, Vol. 3, 337~344頁、1992年を参照されたい。特に、 $\gamma$ イオン切断が促進された。しかしながら、この技法にはいくつかの制限がある。例えば、この技法はMALDI法にまでは拡張されなかった。この技法はまた、分析される配列中にシステイン残基を有するポリペプチドの分析に限定されている。実際のところ、システインは天然ポリペプチドに相当まれにしか存在せず、この技法の有用性に厳しい制限を設けている。

## 【 0 0 0 7 】

したがって、簡単で効率的であり、野生型および変異型ポリペプチドに広く適用可能な、ポリペプチドを配列決定する質量分析法を提供することが求められている。本発明者等はここに、質量分析技法を用いる高感度ポリペプチド配列決定法を提供する。本発明者等は、比較的強い酸基で誘導化されたポリペプチドおよびそのペプチドが、ほぼ $\gamma$ イオン切断のみを提供し、新規に容易に解釈されるスペクトルをもたらすことを見出した。本発明はまた、本発明の方法を都合よく実行できるようにするために用いられるキットに関する。

## 【 0 0 0 8 】

## ( 発 明 の 概 要 )

本発明は、特にポリペプチドの配列決定に有用な質量分析方法およびキットに関する。この方法は、ポリペプチドのアミノ酸配列を決定することを含み、その工程は、

( a ) ポリペプチドのN末端、あるいはそのポリペプチドの1つまたは複数のペプチドのN末端を、ポリペプチドまたはペプチドと結合したときに約2未満の $pK_a$ を有する1つまたは複数の酸性部分で誘導化し、1つまたは複数の誘導化分析物を提供する工程と、

( b ) 質量分析技法を用いて1つまたは複数の誘導化分析物を分析し、切断パターンを提供する工程と、

( c ) その切断パターンを解釈する工程と、を含む。

## 【 0 0 0 9 】

本発明のキットは、ポリペプチドと結合したときに約2未満の $pK_a$ を有する酸性部分を提供する1つまたは複数の酸性部分試薬と、ポリペプチドのN末端、またはそのポリペプチドの1つまたは複数のペプチドのN末端を、1つまたは複数の酸性部分試薬で誘導化する手段とを具える。本発明のキットは、本方法の実施との組み合わせにおいて特に有用である。

## 【 0 0 1 0 】

## ( 発 明 の 詳 細 な 説 明 )

本発明の方法およびキットは、例えば野生型、変異型、および／または合成ポ



リペプチドを含む、ポリペプチドの配列を決定するのに有用である。この方法およびキットは、例えば生物、薬剤、身体の洗浄、および布の洗濯の分野で用いる高分子量ポリペプチドを同定するのに特に有用である。

【 0 0 1 1 】

本発明の方法およびキットは、広範囲に及ぶ有用性を有する。適用例には、これに限定されるものではないが、ペプチドまたはポリペプチド配列の迅速な決定を必要とする生物学的研究の促進、タンパク質中の翻訳後修飾の同定、および例えば市販の洗濯および洗浄製品に用いられるような変異型タンパク質中のアミノ酸修飾の同定、遺伝子クローニング用オリゴヌクレオチドプローブの設計の補助、進化工学研究において形成された生成物の迅速な特性決定、組み合わせ化学およびペプチドライブラリ同定、ならびにプロテオミクス ( p r o t e o m i c s ) が含まれる。

【 0 0 1 2 】

本発明の方法は、質量分析の前に、ポリペプチド、またはそのポリペプチドの開裂によって形成された1つまたは複数のペプチドのN末端に、1つまたは複数の比較的強い酸基を付加することを含む。理論による限定を意図することなく、結果として生じる負に電荷した誘導体は、低エネルギー電荷部位誘導切断を促進すると考えられる。これは特に、ポリペプチドまたはそのペプチドのC末端が塩基性または疎水性である場合、好ましくは塩基性残基である場合に有効である。再び、理論により限定されることなく、塩基性残基が質量分析中にプロトン化される場合、比較的強い酸基が脱プロトン化され、それが塩基性残基において正の電荷と釣り合いを取ると考えられる。誘導体をイオン化するための追加のプロトンは、ほとんどの塩基性残基がすでにプロトン化されているので、本質的に「遊離」となり、ポリペプチド／ペプチドの主鎖アミド基を無作為にイオン化する。さらに、理論により限定されることなく、第2の比較的強い酸基がポリペプチド／ペプチドに組み込まれる場合、その両方の酸基が脱プロトン化され、2つの本質的に「遊離の」プロトンが提供され、ポリペプチド／ペプチドの主鎖アミド基を無作為にイオン化すると考えられる。

【 0 0 1 3 】

本発明の方法を使用すると、切断の効率を著しく増大させる。さらに、同一の配列を有する非誘導化ペプチドに比べて、誘導化ペプチドでは、増大したフラグメントイオン信号対雑音比が観測される。結果として生じる簡単なPSD MALDIおよびエレクトロスプレータンデムマスペクトルは、通常の手順で新規に解釈され得る。

【 0 0 1 4 】

本開示を通じて文献および特許が参照される。本明細書に言及されたすべての参照文献を、参照により本明細書の一部とする。

【 0 0 1 5 】

本明細書で用いられるパーセント、比率、および割合はすべて、他に指定のない限り重量による。

【 0 0 1 6 】

本明細書において、アミノ酸を記述するために略語を用いる。そのような略語を、以下の表1に記載する。表1にはさらに、本発明の実施に有用なアミノ酸残基平均質量を示す。

【 0 0 1 7 】

【 表 1 】

表 1

アミノ酸	3文字略語	1文字略語	アミノ酸残基 平均質量 (Da)
アラニン	A l a	A	71.1
アルギニン	A r g	R	156.2
アスパラギン	A s n	N	114.1
アスパラギン酸	A s p	D	115.1
システイン	C y s	C	103.1
グルタミン	G l n	Q	128.1
グルタミン酸	G l u	E	129.1
グリシン	G l y	G	57.1
ヒスチジン	H i s	H	137.1
イソロイシン	I l e	I	113.2
ロイシン	L e u	L	113.2
リジン	L y s	K	128.2
メチオニン	M e t	M	131.2
フェニルアラニン	P h e	F	147.2
プロリン	P r o	P	97.1
セリン	S e r	S	87.1
トレオニン	T h r	T	101.1
トリプトファン	T r p	W	186.2
チロシン	T y r	Y	163.2
バリン	V a l	V	99.1

## 【 0 0 1 8 】

( 定義 )

本明細書において、「脱離イオン化」という用語は、分析物が固相から気相にイオンとして転移することを指す。

## 【 0 0 1 9 】

本明細書において、「脱離」という用語は、分析物が表面から離れることおよび／または分析物が気相に入ることを指す。

## 【 0 0 2 0 】

本明細書において、「イオン化」とは、正または負の1つまたは複数の電子単位に等しい電荷を、分析物上に作る、または保持するプロセスを指す。

## 【 0 0 2 1 】

本明細書において、「MALDI」という用語は、マトリックス支援レーザ脱離イオン化 (matrix-assisted laser desorption ionization) を指す。

## 【 0 0 2 2 】

本明細書において、「MALDI」に関して「マトリックス」という用語は、試料ステージ上での乾燥時に、レーザ照射に続いて、結晶性マトリックス埋込み分析物が固相から気相または蒸気相に脱離しイオン化できるような方法で、対象のポリペプチド、または対象のそのペプチドと共に溶液に混合することのできる、小さな酸性の吸光化学物質を指す。別法として、ポリペプチド、またはそのペプチドの溶液は、試料ステージ上で予備乾燥した適切なマトリックスに載せることができる。適切なマトリックスの非限定的な例には、ニコチン酸、シナピン酸、フェルラ酸、カフェイン酸、 $\alpha$ -シアノー-4-ヒドロキシケイ皮酸、およびニトロセルロースと混合した $\alpha$ -シアノー-4-ヒドロキシケイ皮酸が含まれる。

## 【 0 0 2 3 】

本明細書において、「エレクトロスプレーイオン化」という用語は、接地対電極に関して高電圧で毛細電極から溶液を静電的にスプレーすることによって溶液からイオンを生成するプロセスを指す。この定義は、エレクトロスプレーイオン化、およびイオンスプレーとも呼ばれる空気圧支援エレクトロスプレーイオン化の両方を含むことを意図する。本明細書において、「エレクトロスプレーイオン化」という用語は、あらゆる液体流量に適用し、マイクロスプレー、およびナノスプレー実験を含むことを意図する。さらに、この定義は、分離せずに直接イオン源に注入されたペプチドの分析、およびエレクトロスプレーイオン化の前に分離されたペプチドまたはペプチド混合物の分析に適用することを意図する。適切なオンライン分離法には、これに限定されるものではないが、HPLC、毛細HPLC、および毛細電気泳動が含まれる。エレクトロスプレーイオン化実験は、多様な質量分析器で行うことができ、これに限定されるものではないが、三連四重極、イオントラップ、直交加速型飛行時間分析器、およびフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴計器が含まれる。

## 【 0 0 2 4 】

本明細書において、「ポリペプチド」という用語は、2つ以上のアミノ酸残基を有する分子を指す。本発明の方法は、高質量ポリペプチドの配列同定に適している。

## 【 0 0 2 5 】

本明細書において、「野生型」という用語は、非突然変異生物によって生成されたポリペプチドを指す。

## 【 0 0 2 6 】

本明細書において、「変異型」という用語は、野生型ポリペプチドとは異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを指す。

## 【 0 0 2 7 】

( 本発明の方法 )

本発明の方法は、ポリペプチドのアミノ酸配列の決定に有用である。「アミノ酸配列の決定」という語句を用いることによって、所与のポリペプチドの全配列を決定することに限定されることを本発明者等は意図しない。そうではなく、この語句によって、本明細書では1つの部分、複数の部分、および／または全配列が決定されることを意味する。

## 【 0 0 2 8 】

本発明の方法は、ポリペプチド、あるいは1つまたは複数のそのペプチドのN末端に、1つまたは複数の比較的強い酸基を付加し、質量分光分析のための、1つまたは複数の誘導化分析物を生成することを含む。このポリペプチド／ペプチドを次に質量分析技法を用いて分析し、切断パターンを提供する。結果として生じる切断パターンを解釈し、それによってポリペプチドの配列を決定することが可能となる。

## 【 0 0 2 9 】

本発明者等は、誘導化基（酸性部分）の酸度が、結果として生じるマスペクトルに重大な影響を及ぼすことを見出した。驚くべきことに、ポリペプチドまたはそのペプチドと結合したときに約2未満の $pK_a$ を有するそのような酸性部分は、所望の配列情報を提供するために容易に解釈される切断パターンを生ずるで

あろう。当業者は、当業界で知られている標準法を用いて、本明細書に記載の  $pK_a$  値を測定することができる。そのような方法の非限定的な例には、例えば、滴定、および電気化学的方法が含まれる。 $pK_a$  値を測定する好ましい方法は滴定によるものである。

#### 【 0 0 3 0 】

本発明の方法は、以下のように実行することができる。

ポリペプチドおよび／またはそのポリペプチドのペプチドの誘導化

本発明の重要な特徴は、対象となるポリペプチド、またはそのポリペプチドのペプチドを、1つまたは複数の比較的強い酸、すなわちポリペプチドまたはそのポリペプチドのペプチドと結合したときに、約2未満、好ましくは約0未満、より好ましくは約-2未満の  $pK_a$  を有する酸性部分で誘導化することである。「ポリペプチドのペプチド」とは、本明細書において、そのポリペプチドが、消化または他の方法で2つ以上のペプチドに開裂すること（本明細書では集合的に「消化」などと呼ぶ）を意味する。結果として生じるペプチドは、本発明の方法によって誘導化される。「結合したとき」とは、本明細書において、ポリペプチドまたはペプチドと共有結合した後に測定されたとおりに、酸性部分の  $pK_a$  が定義されることを意味する。

#### 【 0 0 3 1 】

ポリペプチドまたはそのペプチドは、任意の手段によって生成することができる。例えば、必要であれば、対象となるポリペプチドは分析のために単離される。単離のためにいくつかの手順を用いることができ、例えば、一次元および二次元のゲル電気泳動を含む。他の例として、ポリペプチドは当業界でよく知られる組み合わせ化学の方法によって合成することができる。

#### 【 0 0 3 2 】

消化は多くの方法によって起こることができ、ゲル内または膜上法を含み、好ましくはゲル内である。例えば、Shevchenko等、「Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels」、Analytical Chemistry、Vol. 68、850～8

58頁、1996年を参照されたい。しかしながら、酵素的または化学的に、好ましくは酵素的にポリペプチドを消化することが可能である。塩基性または疎水性残基、最も好ましくは塩基性残基を、得られるペプチドのC末端に、またはC末端の近くに生じる消化手法を用いることがもっとも好ましい。「(末端)に」とは、本明細書において、塩基性または疎水性残基が、ペプチドのC末端残基であることを意味する。「近くに」とは、本明細書において、塩基性または疎水性残基が、好ましくはペプチドのC末端から約40アミノ酸残基以内、より好ましくは約30残基以内、さらに好ましくは約20残基、もっとも好ましくはペプチドのC末端から10アミノ酸残基以内であることを意味する。

#### 【0033】

この手順のために多くの方法を用いることができるが、例えばトリプシン、エンドプロテイナーゼLysC、エンドプロテイナーゼArgC、またはキモトリプシン、好ましくはトリプシン、エンドプロテイナーゼLysC、またはエンドプロテイナーゼArgC、そしてもっとも好ましくはトリプシンを用いて、ポリペプチドを酵素的に消化することが好ましい。トリプシン、エンドプロテイナーゼLysC、およびエンドプロテイナーゼArgCは、結果として生じるポリペプチドのペプチドが、当然ながらそのポリペプチドの元のC末端を除いて典型的にアルギニン、またはリジン残基（塩基性残基）を伴うC末端で終わるので好ましい。特に結果として得られるペプチドのC末端に、またはC末端の近くに塩基性残基が生じる場合、他の酵素も適している。キモトリプシンも消化に好ましく、典型的に疎水性アミノ酸残基で開裂する。化学的消化も有用である。例えば、プロモシアンでの消化は有用である。

#### 【0034】

本発明の方法は、1998年10月13日発行、PerSeptive Biosystems Inc. に譲渡されたPaterson他の米国特許第5821063号に記載の方法に従って、特に記載の消化技法に関して適応させることができる。例えば、薬剤とポリペプチドの比率が異なる複数の試料を用い、本発明に従って誘導化することができる。

#### 【0035】

しかしながら、（間違いなくこれに制限するものではないが）特に小さいポリペプチドの配列を決定するときには、消化は必ずしも必要とは限らない。本明細書において、「小さい」ポリペプチドには、好ましくは約50未満のアミノ酸残基、より好ましくは約40未満の残基、さらに好ましくは約30未満の残基、なおさらに好ましくは約20未満の残基、そしてもっとも好ましくは約10未満のアミノ酸残基を有するものが含まれる。

【 0 0 3 6 】

例えば、ポリペプチドは、組み合わせ化学法を含む、よく知られた手段によって合成されることを特徴とすることができる（「合成ポリペプチド」）。この場合、塩基性または疎水性残基、好ましくは塩基性（もっとも好ましくは、アルギニンまたはリジン）を、得られるポリペプチドのC末端に、またはC末端の近くに有するポリペプチドを合成することがもっとも好ましい。

【 0 0 3 7 】

このポリペプチド（ポリペプチドが、上に定義したように十分に「小さい」場合）、またはそのポリペプチドのペプチドは、（ポリペプチドまたはペプチドと結合したとき）約2未満、好ましくは約0未満、もっとも好ましくは約-2未満の $pK_a$ を有する1つまたは複数の酸性部分で誘導化され、誘導化分析物を提供する。誘導化分析物の酸性部分は、酸性部分試薬でカップリングすることによって調製される。ポリペプチドまたはそのペプチドの酸性部分が本明細書に記載の $pK_a$ を有するならば、この酸性部分試薬は限定されない。カップリングに用いることのできる酸性部分試薬の非限定的な例には、例えば、ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオネート）、S-アセチルメルカプトコハク酸無水物、2-イミノチオレン（T r a u t 試薬とも呼ばれる）、ジチオジグリコール酸無水物、テトラフルオロコハク酸無水物、ヘキサフルオログルタル酸無水物、スルホコハク酸無水物、2-スルホ安息香酸環状無水物、クロロスルホニルアセチル塩化物、および1, 3-プロパンスルトンが含まれる。S-アセチルメルカプトコハク酸無水物、2-イミノチオラン、およびジチオジグリコール酸無水物などの試薬の使用は、酸性部分を生成するために、ペプチドでの誘導化後に酸化を必要とする。酸化の工程を必要としない酸性部分試薬には、例えば、テトラフルオ



ロコハク酸無水物、ヘキサフルオログルタル酸無水物、スルホコハク酸無水物、2-スルホ安息香酸環状無水物、およびクロロスルホニルアセチル塩化物が含まれる。これらの試薬は、合成がより効率的であり、および／またはポリペプチドまたはそのペプチド中の不安定な残基の複雑な酸化がないため、多くの場合好ましい。酸性部分試薬をシステイン含有ペプチドのN末端にカップリングし、続いてシステインスルフヒドリル基をシステイン酸に酸化することは、2つの酸性部分（スルホン酸）を含有するペプチドを生成する1つの手段である。

【 0 0 3 8 】

酸性部分は、もっとも好ましくはスルホン酸である。これらのなかで、より好ましい酸性部分には、2-スルホアセチル部分、3-スルホプロピオニル部分、および2-スルホベンゾイル部分が含まれる。

【 0 0 3 9 】

ジスルホン酸誘導体の使用も好ましい。ジスルホン酸誘導体の使用は、好ましくはペプチドのN末端の近くに両方のスルホン酸基をもたらす。例えば、酸性部分試薬をシステイン含有ペプチドのN末端にカップリングし、続いてシステインスルフヒドリル基をシステイン酸に酸化することは、2つの酸性部分（スルホン酸）を含有するペプチドを生成する1つの手段である。

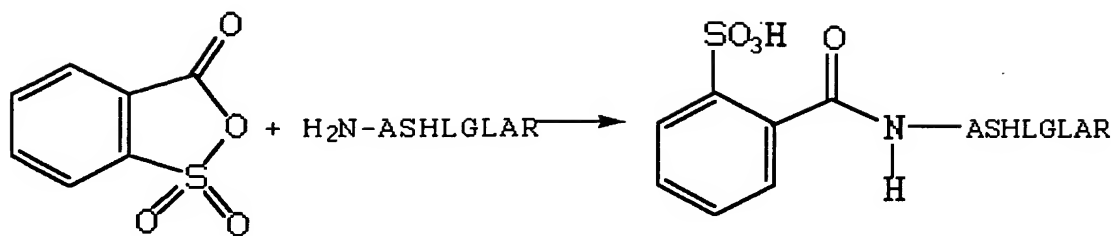
【 0 0 4 0 】

当業者は、本発明によって必要とされる比較的簡単なカップリング手順を実行する能力を有するであろう。しかしながら、便宜のために、対象となるポリペプチド、またはそのポリペプチドのペプチドを誘導化する非限定的な例を以下に例示する。

【 0 0 4 1 】

【 化 1 】

## 実施例 1



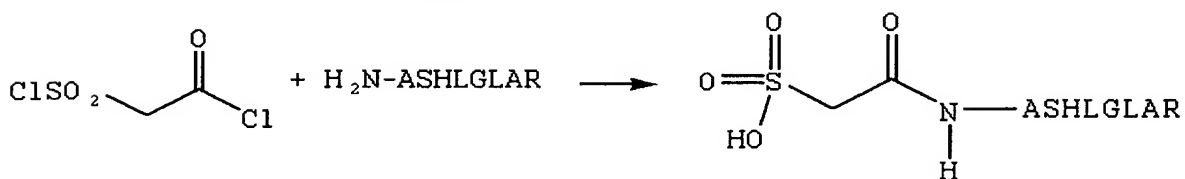
【 0 0 4 2 】

2-スルホ安息香酸環状無水物 (Aldrich Chemical Co.、Milwaukee、WI から市販) を使用前に、乾燥テトラヒドロフラン中 0.1 M の濃度で調製する。ポリペプチド ASHLGLAR (1 nmol、Sigma Chemical Co.、St. Louis、MO から市販) (配列番号 1) を、20  $\mu$  l の 0.05 M トリメチルアミンに希釈する。2-スルホ安息香酸環状無水物溶液 (2  $\mu$  l) を添加し、反応混合物を 30 秒間ボルテックスする。この反応を室温で約 2 分間続けた後、生じる誘導体分析物の希釈、マスペクトルの分析を行う。より少量を誘導化するときには、酸性部分試薬の濃度を 100 分の 1 ほどに減ずる。

【 0 0 4 3 】

【 化 2 】

## 実施例 2



【 0 0 4 4 】

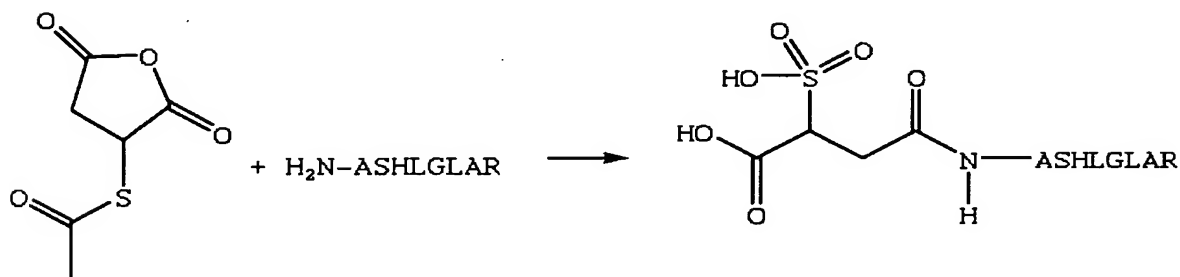
ASHLGLAR (1 nmol、Sigma Chemical Co.、St. Louis、MO から市販) (配列番号 1) を、2  $\mu$  l の純粋クロロスルホニルアセチル塩化物 (Aldrich Chemical Co.、Milwaukee、WI から市販) と 500  $\mu$  l の水を混合することによって形成した 2  $\mu$  l の 0.02 M スルホ酢酸に混合する。この混合物を乾燥し、次に 20  $\mu$  l の

テトラヒドロフラン：ジイソプロピルエチルアミン（4：1 v：v）で再構成する。乾燥テトラヒドロフラン中の0.1Mクロロスルホニルアセチル塩化物（2 $\mu$ l、Aldrich Chemical Co.、Milwaukee、WIから市販）を添加し、混合物を30秒間ボルテックスする。この誘導化反応を周囲温度で約2分間続ける。誘導化分析物を乾燥し、20 $\mu$ lの水で再構成し、さらに希釈してから、マススペクトル分析する。クロロスルホニルアセチル塩化物は、二次元ゲル単離物の誘導化にも有用な試薬であるが、変更した合成手順のほうがより一定した生成物収率を提供する。変更した手順は、実施例14で論ずる。

【 0 0 4 5 】

【 化 3 】

## 実施例 3



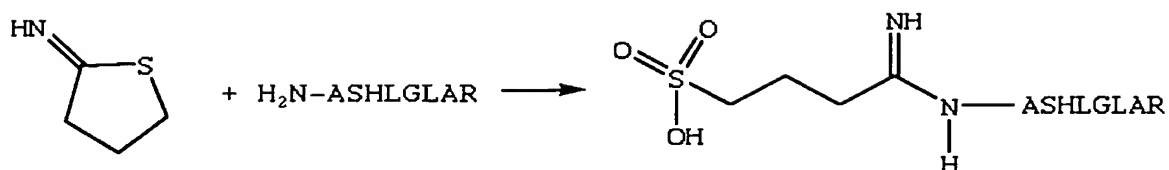
【 0 0 4 6 】

S-アセチルメルカプトコハク酸無水物（Aldrich Chemical Co.、Milwaukee、WIから市販）を使用前に、乾燥テトラヒドロフラン中0.1Mの濃度で調製する。ASHLGLAR（1nmol、Sigma Chemical Co.、St. Louis、MOから市販）（配列番号1）を、20 $\mu$ lの0.05Mトリメチルアミンに希釈する。S-アセチルメルカプトコハク酸無水物溶液（5 $\mu$ l）を添加し、そして反応混合物を30秒間ボルテックスする。この反応を室温で約2分間続け、次に19：1（v：v）の比率で調製した10 $\mu$ lのギ酸（88%）：H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>（30%）で酸化する。酸化を室温で16時間続け、この試料を乾燥した後、希釈およびマススペクトル分析を行う。より少量を誘導化するときには、酸性部分試薬の濃度を100分の1ほどに減ずる。

【 0 0 4 7 】

【 化 4 】

## 実施例 4



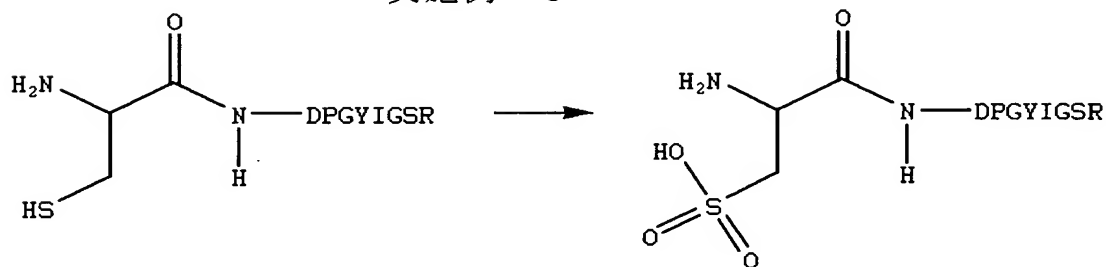
【 0 0 4 8 】

0.1 M トリメチルアミン (20  $\mu$ l) 中の ASHLGLAR (1 nmol、Sigma Chemical Co.、St. Louis、MO から市販) (配列番号 1) に、2-イミノチオレン (Traut 試薬、Aldrich Chemical Co.、Milwaukee、WI から市販) (3  $\mu$ l、脱イオン水中 0.1 M) を添加する。この反応を、室温で 5 分間進める。生成物を、19 : 1 (v : v) の比率で調製した 3  $\mu$ l のギ酸 (88%) : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) で酸化する。酸化を室温で 5 分間続け、誘導化分析物を乾燥した後、マススペクトル分析を行う。

【 0 0 4 9 】

【 化 5 】

## 実施例 5



【 0 0 5 0 】

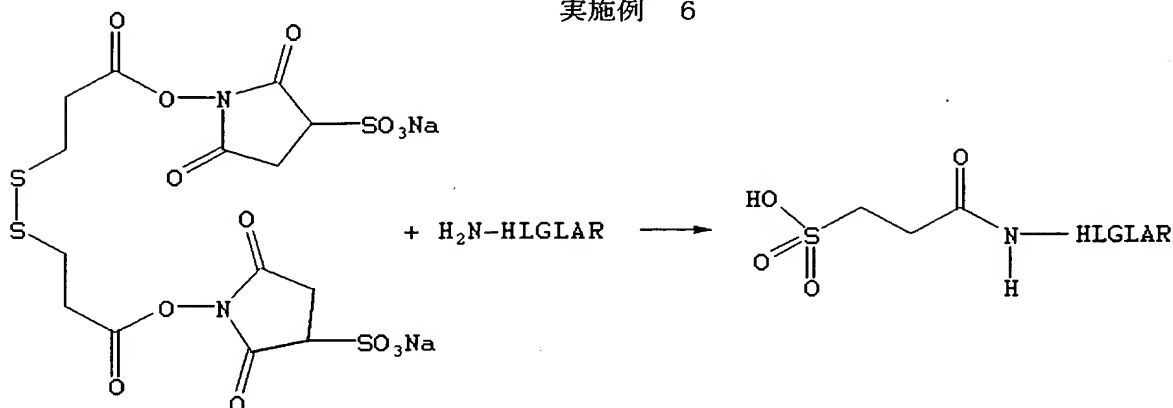
ポリペプチド CDPGYIGSR (Sigma Chemical Co.、St. Louis、MO から市販) (配列番号 2) を、1 から 5 nM のポリペプチド (5 ~ 20  $\mu$ l の水中) と、19 : 1 (v : v) の比率で調製した 10  $\mu$ l のギ酸 (88%) : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) とを混合することによって酸化する。酸化

を室温で30分間続け、この誘導化分析物を乾燥した後、マススペクトル分析を行う。

【0051】

【化6】

実施例 6



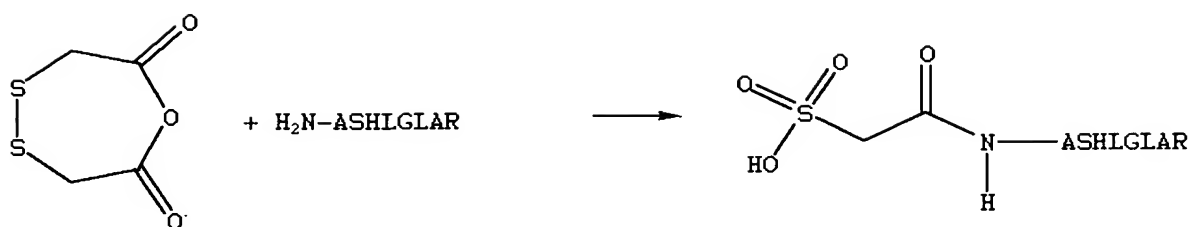
【0052】

ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオネート）（DTSSP）（Pierce Chemical Co.、Rockford、ILから市販）を、50 nM / 20  $\mu$ l でリン酸緩衝食塩水に取り込み、1 N の NaOH で pH を 7.7 に調節する。この溶液（20  $\mu$ l）を、1  $\mu$ l のペプチド HLGLAR（1 nM /  $\mu$ l）（配列番号 3）に添加し、30 分間反応させる。この反応を、トリスーヒドロキシメチルーアミノメタン（0.1 M、20  $\mu$ l）を用いて停止する。この試料を脱塩し、19 : 1（v : v）の比率で調製した 10  $\mu$ l のギ酸（88%） : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>（30%）で酸化する。酸化を室温で30分間続け、この誘導化分析物を乾燥した後、マススペクトル分析を行う。

【0053】

【化7】

## 実施例 7



## 【 0 0 5 4 】

ジチオジグリコール酸 (0.93 g、5.1 mmol、Sigma Chemical Co.、St. Louis、MOから市販) (あるいは、その無水物のポリマー (環式または非環式) を用いてもよい) を、ジクロロメタン (20 ml) に溶解し、不活性雰囲気下に置く。ジシクロヘキシルカルボジイミド (1.05 g、5.1 mmol) を一度に添加する。約96時間後、沈殿物を濾過によって除去し、濾液を真空中で濃縮する。得られた物質をジエチルエーテルに取り込み、濾過する。再び、その濾液を真空中で濃縮し、ジチオジグリコール酸無水物を提供する。

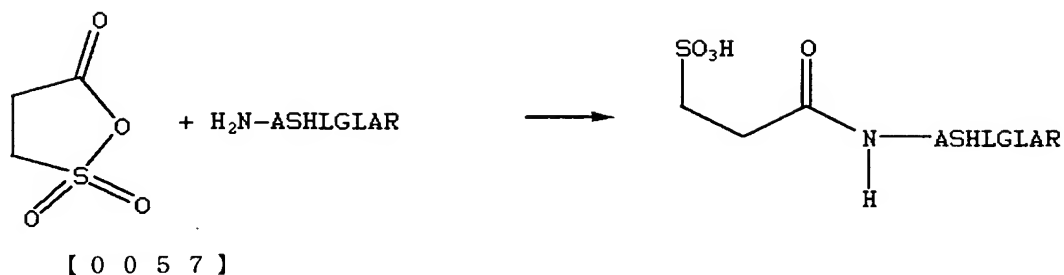
## 【 0 0 5 5 】

ジチオジグリコール酸無水物 (環式型を本実施例に示す) を使用前に、乾燥テトラヒドロフラン中0.1 Mの濃度で調製する。ASHLGLAR (1 nmol) (配列番号1) を、20  $\mu$  lの0.05 Mトリメチルアミンに希釈する。ジチオジグリコール酸無水物溶液 (5  $\mu$  l) を添加し、反応混合物を30秒間ボルテックスする。この反応を室温で約2分間続ける。得られた生成物を、19 : 1 (v : v) の比率で調製した2  $\mu$  lのギ酸 (88%) : H<sub>2</sub>O : (30%) で酸化する。酸化を室温で30分間続け、この誘導化分析物を乾燥した後、マススペクトル分析を行う。より少量を誘導化するときには、酸性部分試薬の濃度を100分の1ほどに減ずる。

## 【 0 0 5 6 】

## 【 化 8 】

## 実施例 8

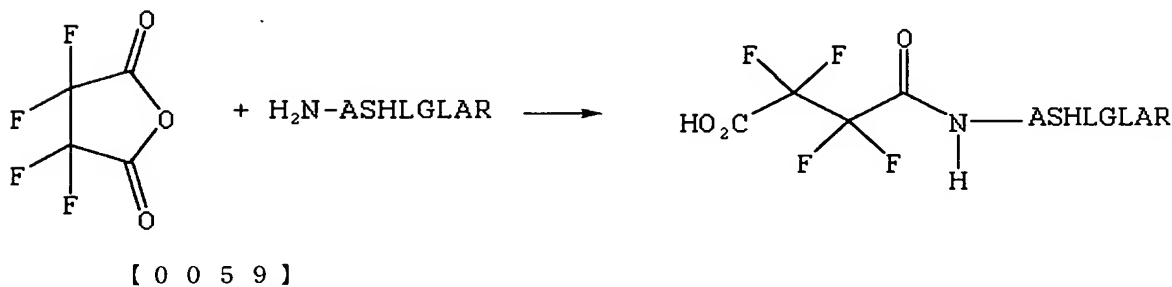


3-スルホプロピオン酸無水物を使用前に、乾燥テトラヒドロフラン中0.1 Mの濃度で調製する。ASHLGLAR (1 nmol) (配列番号1)を、20  $\mu$ lのテトラヒドロフラン：ジイソプロピルエチルアミン4：1 (v：v)に希釈する。3-スルホプロピオン酸無水物溶液 (2  $\mu$ l)を添加し、反応混合物を30秒間ボルテックスする。この反応を室温で約2分間続け、その後、希釈、およびマスマスペクトル分析を行う。より少量を誘導化するときには、酸性部分試薬の濃度を100分の1ほどに減ずる。

【 0 0 5 8 】

【化 9】

## 実施例 9

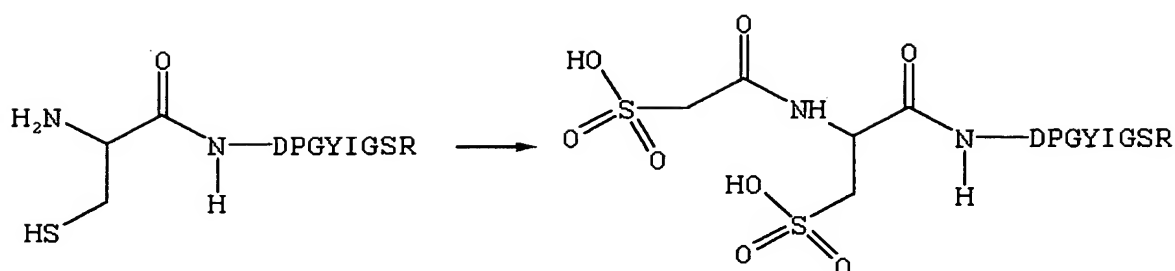


テトラフルオロコハク酸無水物を使用前に、乾燥テトラヒドロフラン中0.1 Mの濃度で調製する。ASHLGLAR (1 nmol) (配列番号1)を、20  $\mu$ lの0.05 Mトリメチルアミンに希釈する。テトラフルオロコハク酸無水物溶液 (2  $\mu$ l)を添加し、反応混合物を30秒間ボルテックスする。この反応を室温で約2分間続け、その後、希釈、およびマスマスペクトル分析を行う。より少量を誘導化するときには、カップリング試薬の濃度を約100分の1に減ずる。

【 0 0 6 0 】

【化 10】

## 実施例 10



## 【 0 0 6 1 】

ポリペプチドCDPGYIGSR (Sigma Chemical Company、St. Louis、MOから市販) (配列番号2) を、 $2\mu\text{l}$ の純粋クロロスルホニルアセチル塩化物 (Aldrich Chemical Co.、Milwaukee、WIから市販) と $500\mu\text{l}$ の水を混合することによって形成した $2\mu\text{l}$ の $0.02\text{M}$ スルホ酢酸に混合する。この混合物を乾燥し、 $20\mu\text{l}$ のテトラヒドロフラン：ジイソプロピルエチルアミン ( $4:1\text{ v:v}$ ) で再構成する。乾燥テトラヒドロフラン中の $0.1\text{M}$ クロロスルホニルアセチル塩化物 ( $2\mu\text{l}$ ) を添加し、この混合物を30秒間ボルテックスする。この誘導化反応を周囲温度で約2分間続ける。誘導化分析物を乾燥し、 $10\mu\text{l}$ の水で再構成する。その溶液に、 $19:1\text{ (v:v)}$ の比率で調製した $10\mu\text{l}$ のギ酸 ( $88\%$ ) :  $\text{H}_2\text{O}$  ( $30\%$ ) を添加する。酸化を室温で5分間続け、N末端の近くに2つのスルホン酸基を有する誘導化ペプチドを生成する。

## 【 0 0 6 2 】

## 質量分析技法を用いる分析

誘導化と同時に、ポリペプチドあるいはそのポリペプチドの1つまたは複数のペプチドを、質量分析技法を用いて分析する。用いられる技法は限定されるものではないが、好ましい技法は、ポストソース分解 (PSD) マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI)、およびエレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析である。例えば、Spengler等、「Peptide Sequencing by Matrix-assisted Laser-desorption Mass Spectrometry」、Rapid Communications in Mass Spectrometry、Vol. 6



、105～108頁、1992年、Spengler等、「Fundamental Aspects of Postsource Decay in Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry」、Journal of Physical Chemistry、Vol. 96、9678～9684頁、1992年、Kaufmann等、「Mass Spectrometric Sequencing of Linear Peptides by Product-ion Analysis in a Reflectron Time-of-flight Mass Spectrometer Using Matrix-assisted Laser Desorption Ionization」、Rapid Communications in Mass Spectrometry、Vol. 7、902～910頁、1993年、Kaufmann等、「Sequencing of Peptides in a Time-of-flight Mass Spectrometer: Evaluation of Postsource Decay Following Matrix-assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)」、International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes、Vol. 131、355～385頁、1994年、Kaufmann等、「Post-source Decay and Delayed Extraction in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Reflectron Time-of-Flight Mass Spectrometry」、Rapid Communications in Mass Spectrometry、Vol. 10、1199～1208頁、1996年、およびSpengler、「Post-source Decay Analysis in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biomolecules」、Journal of Mass Spectrometry、Vol. 32、101

9～1036頁、1997年、Carr等、「Integration of Mass Spectrometry in Analytical Biotechnology」、Analytical Chemistry、Vol. 63、2802～2824頁、1991年、Yates III等、「Mining Genomes With MS」、Analytical Chemistry、Vol. 68、534A～540A頁、1996年、Morris等、「High Sensitivity Collisionally Activated Decomposition Tandem Mass Spectrometry on a Novel Quadrupole/Orthogonal Acceleration Time-of-Flight Mass Spectrometer」、Rapid Communications in Mass Spectrometry、Vol. 10、889～896頁、1996年を参照されたい。もっとも好ましくは、用いられる技法は正イオンモードPSD MALDI、およびエレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析である。便宜のため、以下の実施例11および12に、ポリペプチドまたはそのペプチドの分析に用いることのできる質量分析技法を例示する。

#### 【0063】

本発明者等が意外にも見出したように、適切に誘導化されたポリペプチドまたはポリペプチドのペプチドは、 $y$ イオンによって顕著に特徴づけられたMSMSスペクトルを提供する。当業界でよく知られているとおり、 $y$ イオンは、ポリペプチドまたはペプチドの元のC末端を含有するイオン化フラグメントを指す。本明細書において、「 $y$ イオン」という用語はさらに $(y-NH_3)$ イオンを含み、例えば、第2の塩基性（例えば）残基を含有する不完全消化生成物は、しばしば豊富な $(y-NH_3)$ イオンを生じる。好ましくは、この方法によって生成されたスペクトルは、本質的に $a$ イオンおよび $b$ イオンを含まない。 $a$ イオンおよび $b$ イオンは、主鎖カルボニル基のいずれかの側における開裂によって形成される。重要なことに、電荷は $a$ イオンおよび $b$ イオンを伴うN末端フラグメントに保持されている。本明細書において、 $a$ イオンおよび/または $b$ イオンに関して「本質的に含まない」という用語は、優勢な $y$ イオン系列に比べて、 $a$ イオンお

よびbイオンの集合的相対存在比が約20%未満、好ましくは約10%未満、もっとも好ましくは約5%未満であることを意味する。

【 0 0 6 4 】

本発明の方法によれば、特にポリペプチドの配列が配列データベース中に存在する場合、そのポリペプチドを同定するためにすべての消化生成物を分析および／または同定する必要はない。

【 0 0 6 5 】

(実施例11 - PSDMALDI配列決定技法)

本実施例において、N<sub>2</sub>レーザ(337nm、3nsパルス幅、繰返し数20Hz)を備えたVoyagerDE-RPまたはVoyagerDE-STR(PerSeptive Biosystems Inc.、Framingham、MA)(または適切な同等物)で質量分析技法を実行する。マススペクトルは、遅延引き出しを伴うリフレクトロンモードにおいて得られる。外部質量補正は低質量ペプチド標準を用いて行ない、質量測定の精度は典型的に±0.3Daである。誘導化ポリペプチドまたはペプチドを、0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)中、約10pM/μlに希釈する。次に0.1%TFAを含有する水性50%アセトニトリル1ml中に10mgを溶解することによって調製したαシアノー4-ヒドロキシケイ皮酸(アルファCN)に、この試料をさらに5倍から10倍に希釈する。例えば、Beavis等、「α-Cyano-4-hydroxycinnamic Acid as a Matrix for Matrix-assisted Laser Desorption Mass Spectrometry」、Organic Mass Spectrometry、Vol. 27、156~158頁、1992年を参照されたい。ゲル単離物は、高速蒸発法によって調製したαシアノー4-ヒドロキシケイ皮酸/ニトロセルロース(アルファCN/NC)の薄膜表面から分析する。例えば、Arnott等、「An Integrated Approach to Proteome Analysis: Identification of Proteins Associated with Cardiac Hypertrophy」、Analytical Biochemistry、Vol. 25

8、1～18頁、1998年を参照されたい。

【0066】

時限イオン選別 (timed ion selection) を用いて適切な前駆イオンを単離した後、誘導化分析物に関してPSD MALDIタンデムマスペクトルを得る。この誘導化分析物は、いくつかのMALDIマトリックスを用いて分析することができ、これに限定されるものではないが、アルファCN、アルファCN/NC、および2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB) を含む。フラグメントイオンは、リフレクトロンに印可する電圧のステッピングによって最終検出器に再び集中させる。用いることのできる典型的な電圧比は以下のとおりである。1.0000 (前駆イオンセグメント)、0.9126、0.6049、0.4125、0.2738、0.1975、および0.1213 (フラグメントセグメント) である。個々のセグメントは、PerSeptive Biosystems、Framingham、MAから市販されているソフトウェアを用いて (分析ウインドウから「PSD」を選択) 組み合わせる (または、当業界で通例用いられているように「つなぎ合わせる (stitched together) ) )。すべての前駆イオンセグメントは、検出器が飽和するのを回避するために、<256レーザパルスの低いレーザ出力 (可変減衰器=1450) で得る。残存するすべてのPSD MALDIセグメントを獲得するために、レーザ出力を上げる (可変減衰器=1650)。典型的に、各フラグメントイオンセグメントに関して256レーザパルスが獲得される。このデータは、デジタル化速度20MHzで得る。

【0067】

(実施例12-エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析配列決定技法)

本実施例では、自作のマイクロエレクトロスプレー源 (uES) を備えたLC/Qイオントラップ質量分析計 (ThermoQuest, San Jose, CA) に結合したキャピラリーLCシステム (Perkin Elmer Biosystems, Foster City, CA) を用いて、マスペクトルを得る。0.5×150mm C18 LCカラム (Perkin Elmer Bios

systems, Foster City, CA) を、流量  $5 \mu\text{l}/\text{分}$  で用いる。LC 移動相は水およびアセトニトリルであり、それぞれ 0.02% TFA を含有する。典型的な勾配は、5 分間で 15% のアセトニトリル、次に 40 分をかけて 15~60% のアセトニトリルである。LC カラムの後に分流 T 字管 (1/16 インチ (約 1.6 mm)、内径 0.25 mm、Valco, Houston, TX) を置くことによって、uES 源に  $0.5 \mu\text{l}/\text{分}$ 、UV 検出器に  $4.5 \mu\text{l}/\text{分}$  の流量を得る。誘導化ペプチドまたはポリペプチド試料を、自動試料採取器 (ALCOTT, モデル 719, Norcross, GA) を用いて、LC カラムに注入する。uES 源を、計器の前端に搭載した X、Y、Z マイクロメータ (New Focus Inc., Santa Clara, CA) に收容する。マイクロエレクトロスプレーニードルは、New Objective (Cambridge, MA) の PicoTip (FS360-50-15-D) である。

#### 【0068】

エレクトロスプレータンデムマススペクトルは、以下の計器条件を用いて得る。スプレーニードル電圧 1.5 kV、加熱キャピラリー温度 200℃、および衝突エネルギー 35 eV である。それぞれのフル MS スキャンにおいて、質量範囲 300~2000 m/z を用いる。エレクトロスプレータンデムマススペクトルは、1) フル MS スキャン、2) 電荷状態を決定するための選別イオンのズーム、3) ズームスキャンから選別された適切なイオンの MS/MS スキャン、の 3 つの連続マイクロスキャンからなる「トリプルブレイ」モードでのデータ依存スキミングを用いて得る。これらの 3 つのスキャン事象は、LC 実行の間を通じて繰り返される。

#### 【0069】

##### 切断パターンの解釈

質量分光分析によって生成された切断パターンは、ポリペプチドの配列に解釈される。質量分析の分野の当業者は、市販のソフトウェアまたは配列データベースの助力なしに、小さなポリペプチドの切断パターンを、手動で新規に解釈できるであろう。同様に、当業者はまた、ポリペプチドのペプチド (消化生成物) を

新規に配列を決定することができるであろう。あるいは、当業者は、例えば市販のソフトウェアまたは配列データベースを含む、知られている解釈のための補助物を用いることができる。

【 0 0 7 0 】

例えば、ポリペプチドまたはそのペプチドの配列は、本発明によって生成された y イオン切断パターンを用いて、効率的かつ正確に決定される。個々のアミノ酸残基の同定は、y イオン系列における隣接メンバ間の質量の差異を測定することによって、新規に達成され得る。次に、測定された質量差を、既知のアミノ酸残基質量（上記の表 1 を参照）と比較することによって同定は達成される。例えば、測定された質量差 71.1 Da は、アラニンに相当する。読み取り方向もまた、マスペクトルから直接決定される。低質量から高質量への測定の場合、方向は C 末端から N 末端である。高質量から低質量への測定の場合、読み取り方向は N 末端から C 末端である。

【 0 0 7 1 】

ポリペプチドおよびそのペプチドの配列はまた、解釈されていない y イオン系列質量、または y イオン質量由来の配列タグいずれかのマスペクトル切断データを、配列データベース検索の入力情報として受け入れるソフトウェアを用いて、効率的かつ正確に決定することができる。当業者に通例用いられるそのようなソフトウェアには、これに限定されるものではないが、「Protein Prospector」(University of California, San Francisco、または <http://prospector.ucsf.edu> から入手可能)、および「Peptide Search」(European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany、または <http://www.man.n.embl-heidelberg.de> から入手可能) が含まれる。

【 0 0 7 2 】

本発明によって生成された切断パターンは、これに限定されるものではないが、NCBI 非重複データベース ([ncbi.nlm.nih.gov/blast/db.nrz](http://ncbi.nlm.nih.gov/blast/db.nrz))、SWISPROT ([ncbi.nlm.nih.gov/rep](http://ncbi.nlm.nih.gov/rep)

ository / SWISSPROT / sprout33.dat.z)、EMBL (FTP: / ftp.ebi.ac.uk / pub / databases / peptide search /)、OWL (ncbi.nlm.nih.gov / repository / owl / FASTA.z)、dbEST (ncbi.nlm.nih.gov / repository / dbEST / dbEST.weekly.fasta.mmd.yy.z)、およびGenebank (ncbi.nlm.nih.gov / genebank / genpept.fsa.z)を含むいくつかの配列データベースに対して検索することができる。対象となるポリペプチドの全配列は、本発明の方法を用いて形成された1つまたは複数の関連したペプチド誘導体から生成された切断データを検索することによって、多くの場合、配列データベースから検索することができる。

【 0 0 7 3 】

当然ながら、データベース検索技法を用いるとき、本発明の方法を用いる場合 y イオンおよび ( $y - NH_3$ ) イオンが切断パターンに観測されるもっとも突出した種なので、y イオンまたは ( $y - NH_3$ ) イオンのみを許容フラグメントに指定することによって検索を限定するのがもっとも効率的である。a、b、( $b + H_2O$ )、( $b - H_2O$ )、( $b - NH_3$ )、および内部開裂イオンのような他のフラグメントイオン型は、本発明の方法を用いて誘導化されたペプチドのスペクトルにおいて突出していないので、認められないことがある。本発明で形成された誘導体は、誘導化していない同一のペプチドのスペクトルから得ることができるものに比べて、より高いデータベース検索特定性を多くの場合もたらす単純な切断パターンを提供する。

【 0 0 7 4 】

本発明の方法を、以下の非限定的実施例においてさらに例示する。これらの実施例において、当業者には、新しいタンパク質が継続的にデータベースに加えられているので、生成された「候補タンパク質」の数が本明細書に開示されたものと異なる可能性があることが理解されよう。

【 0 0 7 5 】

( 実施例 1 3 )

高質量ポリペプチドのPSD MALDIタンデム質量分析を、酸化インシュリンB鎖、FVNQHLC(SO<sub>3</sub>H)GSHLVEALYLVC(SO<sub>3</sub>H)GERGFYTPKA(配列番号4)(MMcalc=3495.9Da)(Sigma Chemical Co., St. Louis, MOから市販)で示す。このポリペプチドの質量は、ほとんどの従来型三連四重極計器の上限をはるかに超えている。この天然ポリペプチドのタンデムマススペクトルは、本質的にyイオンからなる比較的強いイオン系列を示す。y<sub>9</sub>とy<sub>24</sub>の間の、すべてのyイオンが容易に観測される。分子のN末端を定義する配列特定フラグメント、y<sub>25</sub>からy<sub>29</sub>はスペクトルに存在しない。

【0076】

このポリペプチドのスペクトルは、酸性部分試薬スルホ安息香酸環状無水物(Aldrich Chemical Co., St. Louis, MOから市販)を用いて誘導化することによって改善される。誘導化ポリペプチドは、分子のN末端領域由来のyイオン(y<sub>25</sub>、y<sub>26</sub>、y<sub>27</sub>、y<sub>28</sub>、およびy<sub>29</sub>)の著しい強化を示す。y<sub>8</sub>からy<sub>29</sub>に、yイオンの完全な系列が誘導化に続いて観測される。突出するbイオンは検出されない。

【0077】

(実施例14)

二次元ゲル電気泳動によって分離されたポリペプチドを、トリプシンを用いてゲル内消化し、そのポリペプチドのペプチドを生成する。このペプチドは、MALDIによっていくつかの強いMH<sup>+</sup>シグナルを示し、m/z 1060.8、1090.8、1271.0、1299.0、1312.0、1344.0、1399.1、1450.1、1460.1、および1794.4におけるイオンを含む。Protein Prospector Softwareを用いるNCBIタンパク質配列ライブラリのエントリに対するデータベース検索は、入力されたトリプシン質量の5つ以上に一致する41個の候補タンパク質のリストをもたらす(検索パラメータ: MW範囲1000から150000、等電点3.0から10.0、副反応として酸化Met許容、保存質量許容範囲+/-0.6Da)。



【 0 0 7 8 】

このポリペプチドのペプチドは、上記実施例に論じたいくつかの試薬のいずれかで誘導化することができる。それらには、これに限定するものではないが、2-スルホ安息香酸環状無水物、3-スルホプロピオン酸無水物、またはクロロスルホニルアセチル塩化物が含まれる。本実施例では、酸化部分試薬としてクロロスルホニルアセチル塩化物を用いる。二次元ゲル電気泳動から単離された低レベルペプチドのための誘導化手順を、再現性および誘導体収率を向上させるために変更する。典型的に、二元性ゲルからのペプチド抽出物は、*speed vac*で、ほぼ乾燥するまで濃縮する（5から10  $\mu$ l）。この濃縮物を、15  $\mu$ lの0.1% TFAで酸性化し、市販のC18ミニカラム（Zip Tip（商標）、Millipore Corporation, Bedford, MA 01730）を用いて洗浄する。洗浄した試料を*speed vac*上で乾燥し、10  $\mu$ lの塩基（THF : DIEA 19 : 1 v/v）で再構成する。本実施例では、2  $\mu$ lのクロロスルホニルアセチル塩化物溶液（1 ml THF中純粋液体2  $\mu$ l）を添加し、この反応を室温で1から2分間続ける。誘導化試料を再び*speed vac*で乾燥し、分析に先立って、10  $\mu$ lの0.1% TFAで再構成する。この段階で、試料をMALDIマトリックスに混合し、一部を分析のために試料ステージに載せることができ、あるいは市販のC18ミニカラム（Zip Tip（商標）、Millipore Corporation）を用いて再び洗浄してもよい。次に洗浄試料を、10 mg/mlのMALDIマトリックス含有アセトニトリル : 0.1% TFA（1 : 1 v/v）1~2  $\mu$ l体積で、Zip TipからMALDI試料ステージ上に直接溶出する。この後者の手順は、すべての回収誘導体をMALDI試料ステージに分析のために供することを可能にし、それによってこの方法の全体的な感度を向上させる。PSD MALDIタンデム質量分析を、重さ約1572 Daの誘導化ペプチドについて行う。 $m/z$  574.5、661.7、875.9、1003.8、1103.9、1204.6、1304.1でyイオンを有し、 $m/z$  1451.0で（MH+誘導体）イオンを有する配列タグが得られる。このスペクトルをタンパク質配列データベースに対して検索し、6つの候補タンパク質（すべて、ミトコンドリアアスパラギ

ン酸アミノトランスフェラーゼ) が返答される ( 検索パラメータ : MW 範囲 1000 から 150000、親イオン質量許容範囲  $\pm 0.6$  Da、フラグメントイオン質量許容範囲  $\pm 2.5$  Da、親 (モノアイソトピック) フラグメント (平均)、欠損イオンの許容数 = 1 )。データベース検索は y イオンのみを許容フラグメントとみなすように制約されているので、このレベルの特定性が得られる。これらの誘導体のタンデムマススペクトルにおいて、(本発明による誘導化のため) N 末端および内部開裂イオンが突出していないので、検索のこのような制約が可能である。同一のタンデムマススペクトルを全ライブラリに対して検索し、すべてのフラグメントイオン型 ( a、b、( b + H<sub>2</sub>O )、( b - NH<sub>3</sub> )、( b - H<sub>2</sub>O )、内部、および y ) が許容されるとき、はるかに低い特定性が得られる ( 239 個の候補タンパク質を返答 )。このペプチドは F V T V Q T I S G T G A L R と同定された ( 配列番号 5 )。

【 0 0 7 9 】

このタンパク質同定の確認は、重さ約 1916 Da の誘導体の P S D M A L D I によって求められる。このスペクトルは、プロトン化前駆イオンに加えて、 $m/z$  724.6、1154.2、1299.3、1439.0、1551.9、1665.5、および 1779.2 に 7 個のフラグメントイオンを含有する。このスペクトルを、フラグメントが y イオンであると仮定して、データベースに対して検索する。この検索は、ミトコンドリアアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、または他のどのような候補タンパク質も返答しない。y イオンと ( y - NH<sub>3</sub> ) イオンの両方を許容するデータベースの調査は、16 個の候補タンパク質を返答し、そのうちの 10 個がミトコンドリアアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼである。後者の検索は、このタンパク質同定を確認する。このペプチドは第 2 のアルギニン残基を含有する不完全トリプシン生成物 ( I L I R P L Y S N P P L N G A R ) ( 配列番号 6 ) であるため、可能なフラグメントとして ( y - NH<sub>3</sub> ) イオンを包含することは、この特定の検索に関して必要とされる。本明細書に上述したとおり、誘導化不完全消化生成物はしばしば、P S D タンデムマススペクトルに ( y - NH<sub>3</sub> ) フラグメントイオンを示す。

【 0 0 8 0 】

## ( 実施例 15 )

二次元ゲル電気泳動から単離されたタンパク質のゲル内トリブシン消化物を、本明細書実施例 14 による誘導化に続いて、LCQ イオントラップの LC エレクトロスプレータンデム質量分析によって分析する。すべてのスペクトルは、マイクロスキンの「トリプルブレイ」配列を用い、自動データ依存モードにおいて無人で獲得される。誘導化トリブシンペプチドのタンデムマスマスペクトル ( $MH^+ = 971.5$ ) は、 $m/z$  401.1、538.3、651.3、750.4 を含むいくつかの y 型生成物イオンを示す。測定された y イオンは、非誘導化トリブシンペプチドの  $MH^+$  質量と共に ( $971.5 - 122 = 849.5$ )、データベース検索のために入力情報として用いられる。Protein Prospector Software を用いる NCBI タンパク質配列ライブラリに対するデータベース検索は、3 つの候補タンパク質を返答する (検索パラメータ: MW 全範囲、親イオン許容範囲  $+/- 0.6 Da$ 、フラグメントイオン許容範囲  $+/- 1.0 Da$ 、モノアイソトピック親イオンおよびフラグメントイオン、欠損イオンは許容されない)。データベース検索から返答された 3 つの候補タンパク質はすべてハプトグロビンである。このペプチドは、VVLHPER として同定された (配列番号 7)。

## 【 0081 】

このタンパク質同定の確認は、第 2 の誘導化ペプチドから生成されたタンデムマスマスペクトルを用いて (誘導体の  $MH^+ = 771.4 Da$ )、データベース検索によって試みる。このスペクトルは、 $m/z$  322.1、436.2、および 535.3 の y 型イオンを含むいくつかのイオンを示した。上記と同じ検索パラメータを用いるとき、エレクトロスプレータンデムマスマスペクトルからの入力データと 3 つのペプチド配列が一致する。3 つのペプチド配列の 1 つは、ハプトグロビンのものに相当する。そのペプチドの同定は、NVNFR として確立された (配列番号 8)。結果は、このタンパク質の同一性を確認する。

## 【 0082 】

## ( 実施例 16 )

本発明の方法は、変異型ポリペプチドを同定するために容易に用いられる。酵

素単離物のトリプシン消化物のMALDIマスペクトルは、市販のプロテアーゼSavinase（登録商標）（Novo Nordisk、Copenhagen、Denmarkから市販）と同一の、多くのトリプシン質量を示す。予想されたトリプシンペプチドの1つGVLVVAASGNSGAGSISYPAR（MH<sup>+</sup>=1933Da）（配列番号9）がスペクトルから欠けており、未知のイオンがm/z 1963に観測される。これは、この単離物がSavinase（登録商標）変異型であることを示唆する。11個の異なる単一アミノ酸の交換によって、観測された+30Daの質量シフトの理由を説明することができた（4G→S、4A→T、および3V→E）。このPSD MALDIタンデムマスペクトルは、例えば本明細書の実施例2に例示したように、誘導化に続いて獲得される。yイオンの完全な系列が、21個のアミノ酸ペプチドに関して観測される。このスペクトルは、残基14でグリシンがセリンに変換していることを実証する。すべてのyイオンの質量は、このスペクトルにおいて測定される。このスペクトルは、PerSeptive Biosystems MALDIデータシステムに含まれるペプチドラダー配列決定プログラムを用いて、自動的に解釈される。

【0083】

（実施例17）

ペプチドのN末端の近くに両方のスルホン酸基を有するジスルホン酸誘導体の使用を、本明細書の実施例5および実施例10に従って誘導化されたCDPGYIGSR（配列番号2）から生成されたMALDI PSDスペクトルの比較によって実演する。システイン残基のスルフヒドリル基の過ギ酸酸化によって形成された誘導体（実施例5）を、 $\alpha$ -シアノー-4-ヒドロキシケイ皮酸のマトリックスからのPSD MALDIを用いて分析する。得られたPSDスペクトルは、不安定なAsp-Proアミド結合の開裂によって形成されたy7フラグメントイオンが優勢である。より低い質量のy型イオンは、比較的低い存在比を示す。例えば、y7イオンに対するy3、およびy4イオンの存在比は、それぞれわずか約8%、および5%である（ピーク高さの比）。理論による限定を意図することなく、Proアミド窒素は他の主鎖アミド基より塩基性であるので、「移動

」イオン化プロトンは塩基性 A s p - P r o アミド窒素原子に優先的に局在していると考えられる。この電荷局在化イオンは、A s p とプロトン化 P r o との間の、アミド結合の優先的切断をもたらすと考えられる。この問題は、実施例 10 に従って、ペプチドの N 末端の近くに第 2 のスルホン酸基を付加することによって最小化される。第 2 のスルホン酸基の付加は、M A L D I P S D 分析に用いる正に電荷したイオンを生成するために、第 2 の「移動」プロトンの付加を必要とする。再び、理論による限定を意図することなく、比較的塩基性の P r o 基がすでにイオン化されているので、この第 2 のプロトンは他の主鎖アミド基を遊離してイオン化すると考えられる。他の主鎖アミド基のプロトン化は、それらの基の切断を強化し、M A L D I P S D スペクトルにおいて対応する y イオンの相対存在比を増大する。実施例 10 に従って形成された誘導体の P S D スペクトルにおいて、y 3、および y 4 イオンの存在比は、y 7 イオンに対してそれぞれ約 41%、および 57%（ピーク高さの比）に増大する。

#### 【 0 0 8 4 】

##### （本発明のキット）

本発明の他の実施形態は、ポリペプチドのアミノ酸配列を決定するために用いることのできるキットである。このキットは、

（a）ポリペプチド、あるいはそのポリペプチドの 1 つまたは複数のペプチドと結合したとき、約 2 未満の p K a を有する酸性部分を提供する 1 つまたは複数の酸性部分試薬と、

（b）ポリペプチドの N 末端、あるいはそのポリペプチドの 1 つまたは複数のペプチドの N 末端を、1 つまたは複数の酸性部分試薬で誘導化するための手段と、を具える。

#### 【 0 0 8 5 】

本発明のキットは、例えば 1998 年 10 月 27 日発行、P e r S e p t i v e B i o s y s t e m s , I n c . に譲渡された P a t t e r s o n の米国特許第 5,827,659 号に記載のサンプルホルダに類似の方式で、質量分析に適応させることができる。

#### 【 0 0 8 6 】

任意選択で、このキットはさらに、例えば質量分析技法の精度を試験するために、1つまたは複数の検証ペプチドを含むことができる。参照マススペクトルデータも、任意選択で包含することができる。

【0087】

このキットに含むことのできる酸性部分試薬は、上に記載している。

【0088】

誘導化のための特に好ましい手段には、誘導化ポリペプチドまたはペプチドを得ることに関心のある分析者または任意の他の人によって、都合よく誘導化される方法が含まれる。誘導化の特に好ましい手段は、例えば酸性部分試薬、および最後に対象となるポリペプチド／ペプチドを含有するための、1つまたは複数の保持装置を含む。

【0089】

適切な保持装置には、例えば、バイアル、チューブ、ピペットチップ、プレート、サンプルホルダ、およびマルチウェルプレートが含まれる。分析者が添加する必要がないように酸性部分試薬が保持装置内に存在する場合、任意選択の便宜が提供される。例えば、酸性部分試薬はピペットチップの内部に存在し、ポリペプチドまたはペプチドが適切な緩衝剤でチップに引き込まれたときに活性化されることができる。保持装置は、もっとも好ましくは使い捨て可能なものであるが、そうである必要はない。

【0090】

酸性部分試薬は、固体支持体に結合していてもよい。例えば、試薬はピペットチップ内部で支持体に結合されていてよい。対象となるポリペプチドまたはペプチドを適切な緩衝剤系に取り込み、結合試薬上に繰り返し吸引することができる。反応後、適量の誘導化ポリペプチドまたはペプチドを、MALDI質量分析試料ステージに直接載せることができ、あるいはエレクトロスプレーイオン化質量分析装置に注入することができる。

【0091】

誘導化を促進するために用いられる1つまたは複数の緩衝剤系も、本発明のキットに含むことができる。包含に適した緩衝剤系は、含まれる酸性部分試薬によ

って決まる。好ましい緩衝剤系の例は、上記の誘導化実施例に開示している。特に好ましい緩衝剤系には、これに限定されるものではないが、第三級アミン溶液（水系および非水系の両方（例えば、テトラヒドロフランの溶液））、および純粋第三級アミンが含まれる。特に好ましい第三級アミンには、トリメチルアミン、トリエチルアミン、およびジイソプロピルエチルアミンが含まれる。

【 0 0 9 2 】

本発明のキットはまた、本明細書に記載したような、1つまたは複数の消化助剤を含むことができる。消化助剤は、化学的であっても、酵素的であってもよい。例えば、トリプシン、エンドプロテイナーゼ L y s C、エンドプロテイナーゼ A r g C、および／またはキモトリプシン、好ましくは、トリプシン、エンドプロテイナーゼ L y s C、および／またはエンドプロテイナーゼ A r g C、もっとも好ましくはトリプシンを消化助剤に包含することができる。臭化シアンなどの化学的消化助剤も本発明に包含できる。

【 配 列 表 】

## SEQUENCE LISTING

<110> Keough, Thomas W.  
 Youngquist, Robert S.  
 5 <120> Methods and Kits for Sequencing Polypeptides  
 <130> Methods/Kits for Sequencing Polypeptid  
 10 <140> 7379P2  
 <141> 1999-09-29  
 <160> 9  
 15 <170> PatentIn Ver. 2.0  
 <210> 1  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 20 <213> synthetic construct  
 <400> 1  
 Ala Ser His Leu Gly Leu Ala Arg  
 1 5  
 25  
 <210> 2  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 30 <213> synthetic construct  
 <400> 2  
 Cys Asp Pro Gly Tyr Ile Gly Ser Arg  
 1 5  
 35  
 <210> 3  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 40 <213> synthetic construct  
 <400> 3  
 His Leu Gly Leu Ala Arg  
 1 5  
 45  
 <210> 4  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 50 <213> bovine insulin  
 <400> 4



Phe Val Asn Gln His Leu Xaa Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
 1 5 10 15  
 5 Leu Val Xaa Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Ala  
 20 25 30  
 <210> 5  
 <211> 14  
 10 <212> PRT  
 <213> pre adipocytes  
 <400> 5  
 Phe Val Thr Val Gln Thr Ile Ser Gly Thr Gly Ala Leu Arg  
 15 1 5 10  
 <210> 6  
 <211> 16  
 20 <212> PRT  
 <213> pre adipocytes  
 <400> 6  
 Ile Leu Ile Arg Pro Leu Tyr Ser Asn Pro Pro Leu Asn Gly Ala Arg  
 25 1 5 10 15  
 <210> 7  
 <211> 7  
 30 <212> PRT  
 <213> rat lymph  
 <400> 7  
 Val Val Leu His Pro Glu Arg  
 35 1 5  
 <210> 8  
 <211> 5  
 40 <212> PRT  
 <213> rat lymph  
 <400> 8  
 Asn Val Asn Phe Arg  
 45 1 5  
 <210> 9  
 <211> 21  
 50 <212> PRT  
 <213> Unknown  
 <220>  
 55 <223> Description of Unknown Organism: Peptide  
 <400> 9  
 Gly Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Gly Ser Ile  
 1 5 10 15  
 60 Ser Tyr Pro Ala Arg  
 20

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 00/00790

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 GOIN33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 GOIN

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BEILSTEIN Data, EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, BIOSIS

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	COX K A ET AL: "Role of the Site of Protonation in the Low-Energy Decompositions of Gas-Phase Peptide Ions" JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MASS SPECTROMETRY, US, ELSEVIER SCIENCE INC, vol. 7, no. 6, 1 June 1996 (1996-06-01), pages 522-531, XP004052038 ISSN: 1044-0305 cited in the application page 523, column 2, line 13, paragraph 2 - line 24 ----- -/-	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 July 2000

Date of mailing of the international search report

17/07/2000

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hart-Davis, J

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. nal Application No  
PCT/US 00/00790

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NAKANISHI T ET AL: "Electrospray Ionization—Tandem Mass Spectrometry Analysis of Peptides Derived by Enzymatic Digestion of Oxidized Globin Subunits: An Improved Method to Determine Amino Acid Substitution in the Hemoglobin 'Core'" JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MASS SPECTROMETRY,US,ELSEVIER SCIENCE INC, vol. 7, no. 10, 1 October 1996 (1996-10-01), pages 1040-1049, XP004070144 ISSN: 1044-0305 the whole document	1-10
A	ROTH K.D.W., HUANG Z.-H., SADAGOPAN N., WATSON J.T.: "Charge derivatization of peptides for analysis by mass spectrometry" MASS SPECTROM. REV., vol. 17, 1998, page 255 XP000922702 the whole document	1-10
A	HUANG Z.-H., WU J., ROTH K.D.W., YANG Y., GAGE D.A., WATSON J.T.: "A picomole-scale method for charge derivatization of peptides for sequence analysis by mass spectrometry" ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 69, 1997, pages 137-144, XP002141708 the whole document	1-10
P,X	KEOUGH, T.; YOUNGQUIST, R. S.; LACEY, M. P.: "A method for high-sensitivity peptide sequencing using postsurface decay matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry" PROC. NATL. ACAD. SCI. U. S. A., vol. 96, June 1999 (1999-06), pages 7131-7136, XP002141709 the whole document	1-10
T	DATABASE CHEMICAL ABSTRACTS 'Online! American Chemical Society (via STM, Karlsruhe); Accession Number 2000:391605 (CAPLUS), BAUER, MARK D.; SUN, YIPING; KEOUGH, THOMAS ; LACEY, MARTIN P.: "Sequencing of sulfonic acid derivatized peptides by electrospray mass spectrometry" XP002141711 abstract & RAPID COMMUN. MASS SPECTROM., vol. 14, no. 10, 2000, pages 924-929, — —/—	1-10

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 00/00790

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	<p>HUANG ZHI-HENG; SHEN TUNLI; WU JIANG; GAGE DOUGLAS A; WATSON J THROCK: "Protein sequencing by matrix-assisted laser desorption ionization-postsource decay-mass spectrometry analysis of the N-Tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphine-acetylated tryptic digests" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 268, 15 March 1999 (1999-03-15), pages 305-317, XP002141710 the whole document</p> <p>---</p>	1-10
P, A	<p>CHEN X ET AL: "Isotope Edited Product Ion Assignment by alpha-N Labeling of Peptides with <sup>3</sup>H(50%)/2,4-Dinitrofluorobenzene" JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MASS SPECTROMETRY, US, ELSEVIER SCIENCE INC., NEW YORK, NY, vol. 10, no. 5, May 1999 (1999-05), pages 448-452, XP004164485 ISSN: 1044-0305 the whole document</p> <p>-----</p>	1-10

## フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

Fターム(参考) 2G045 AA34 DA36 FB01 FB05 JA01  
4B063 QA13 QQ79 QR16 QR41 QS12  
QS28 QS36 QS39 QX10

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**